



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ESTUDO ESPECTROSCÓPICO POR RMN DE SCUTIANINAS.

RODRIGO SLAVIERO

**Florianópolis
Novembro/2009**

RODRIGO SLAVIERO

ESTUDO ESPECTROSCÓPICO POR RMN DE SCUTIANINAS.

Relatório apresentado ao
Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial da
disciplina de Estágio Supervisionado
II (QMC 5512)

Prof. Dr. Antonio Carlos Joussef – orientador

**Florianópolis
2009/02**

RODRIGO SLAVIERO

ESTUDO ESPECTROCÓPICO POR RMN DE SCUTIANINAS.

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Joussef

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes

Prof. MSc. Cristian Soldi

Florianópolis
Novembro/2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Fiorindo e Maura Slaviero, e aos amigos Rozaito Peres da Silveira e Sérgio Murilo Machado, por me darem força e não me deixar desistir.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Fiorindo e Maura, por entenderem os momentos em que não estava presente, e por me auxiliarem durante todo o curso.

Aos professores Antônio Carlos Joussef e Miguel Soriano Balparda Caro por me orientarem durante a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Aos colegas Leonardo Oliveira e Patrícia Tuzimoto que me auxiliaram na realização deste trabalho, e a todos os outros colegas e professores com quem tive a oportunidade de trocar experiência ao longo destes anos.

Aos amigos Sérgio Murilo Machado e Rozaito Peres da Silveira que me ajudaram a corrigir este trabalho e tiveram paciência em me agüentar nos momentos de stress.

Aos agentes financiadores, CNPq e CAPES.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Classificação dos Alcalóides Ciclopeptídicos.....	3
2.1.1. <i>Alcalóides Ciclopeptídicos de Treze Membros</i>	4
2.1.2. <i>Alcalóides Ciclopeptídicos de Quinze Membros</i>	4
2.1.3. <i>Alcalóides Ciclopeptídicos de Quatorze Membros</i>	4
2.1.4. <i>Ciclopeptídeos Neutros</i>	8
2.2. Estereoquímica.....	9
2.2.1. <i>Técnicas de RMN para Determinação da Estereoquímica</i>	10
3. OBJETIVOS.....	12
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	13
4.1. Scutianina e Scutianeno.....	13
4.1.1. <i>Medidas de RMN</i>	13
4.1.1.1. <u>Espectros de RMN de ^1H</u>	13
4.1.1.2. <u>Espectros de RMN de ^{13}C/DEPT</u>	13
4.1.1.3. <u>Espectros de RMN 2D</u>	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1. Scutianeno D.....	15
5.1.1. <i>RMN de ^1H</i>	15
5.1.2. <i>RMN de ^{13}C</i>	17
5.1.3. <i>DEPT</i>	18
5.1.4. <i>COSY</i>	19
5.1.5. <i>HSQC</i>	21
5.1.6. <i>NOESY</i>	22
5.2. SCUTIANINA C.....	24
5.2.1. <i>RMN de ^1H</i>	24
5.2.2. <i>RMN de ^{13}C</i>	25
5.2.3. <i>DEPT</i>	26
5.2.4. <i>COSY</i>	27
5.2.5. <i>HSQC</i>	28
5.2.6. <i>NOESY</i>	29

6. CONCLUSÃO.....	31
7. BIBLIOGRAFIA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – a – <i>Scutia buxifolia</i> ; b – Caule da <i>Scutia buxifolia</i>	2
Figura 2 – Estrutura geral de alcalóides ciclopeptídicos, proposta por Tschesche.....	3
Figura 3 – a – 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina; b – <i>trans</i> -3-hidroxiprolina.....	4
Figura 4 – 2-metóxi-5-vinil-fenilalanina.....	4
Figura 5 – a – β -hidroxiaminoácido; b – hidroxiestirilamina.....	5
Figura 6 – Scutianina-A.....	5
Figura 7 – Estrutura das scutianina do tipo Frangulanina.....	6
Figura 8 – Estrutura das scutianinas do tipo Integerrina.....	7
Figura 9 – Estrutura das scutianinas do tipo Frangulanina com aminoácido intermediário na posição E.....	8
Figura 10 – Scutianeno D.....	9
Figura 11 – Scutianeno D numerado.....	15
Figura 12 – Espectro de RMN de ^1H do Scutianeno D, em DMSO.....	15
Figura 13 – Espectro expandindo de RMN de ^1H , região entre 6,3-8,5 ppm do Scutianeno D, em DMSO.....	16
Figura 14 – Espectro de RMN de ^{13}C do Scutianeno D, em DMSO.....	17
Figura 15 – Espectro expandindo de RMN de ^{13}C , região entre 115,8-142,4 ppm do Scutianeno D, em DMSO.....	18
Figura 16 – Espectro de ^{13}C DEPT 135 $^\circ$, do Scutianeno D, em DMSO.....	19
Figura 17 – Espectro de RMN de 2D, COSY, do Scutianeno D, em DMSO, a 400.13 MHz.....	20
Figura 18 – Espectro de RMN de 2D, HSQC, do Scutianeno D, em DMSO, a 400.13 MHz.....	21
Figura 19 – Espectro de RMN de 2D, NOESY, do Scutianeno D, em DMSO, a 400.13 MHz.....	23
Figura 20 – Scutianina C.....	24
Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H da Scutianina C, em CDCl_3	25
Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C da Scutianina C, em CDCl_3	25
Figura 23 – Espectros parciais de ^{13}C DEPT, da Scutianina C, em CDCl_3	27
Figura 24 – Espectro de RMN de 2D, COSY, da Scutianina C, em CDCl_3 , a 400.13 MHz.....	28

Figura 25 – Espectro de RMN de 2D, HSQC, da Scutianina C, em CDCl ₃ , a 400.13 MHz.....	29
Figura 26 – Espectro de RMN de 2D, NOESY, da Scutianina C, em CDCl ₃ , a 400.13 MHz.....	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Alcalóides ciclopeptídicos de catorze membros do tipo frangulanina.....	7
Tabela 2 – Alcalóides ciclopeptídicos de catorze membros do tipo integerrina..	7
Tabela 3 – Alcalóides ciclopeptídicos de catorze membros do tipo frangulanina com aminoácido intermediário na posição E.....	8
Tabela 4 – Dados de RMN de ^{13}C do Scutianeno D e da Scutianina D.....	24

RESUMO

No presente trabalho foram estabelecidas as estruturas da Scutianina C e do Scutianeno D, com a finalidade de esclarecer dúvidas, surgidas durante a revisão da literatura. A análise destes compostos por técnicas de RMN em uma e duas dimensões possibilitou obter, a partir de amostras puras cedidas pelo prof. Ademir Morel (DQ-UFSM), completar os dados de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C . Além das respectivas estruturas foi determinada a estereoquímica relativa de alguns centros quirais do Scutianeno D e da Scutianina C.

Palavras-chave: Scutianinas, alcalóides ciclopeptídicos, RMN, estereoquímica.

1. INTRODUÇÃO

Em épocas muito antigas, sabia-se que os extratos brutos de plantas eram remédios eficientes ou venenos poderosos. Com isso, pesquisadores começaram a se interessar pelo seu isolamento e a identificação de seus princípios ativos. Já no século XIX, farmacêuticos conseguiram isolar e identificar os primeiros alcalóides e no século XX, por sua vez, foi isolada da *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamnaceae) (Fig. 1-a) a Scutianina-A, um alcalóide ciclopeptídico.¹

Os Alcalóides Ciclopeptídicos são por definição compostos básicos que contêm nitrogênio, onde um dos nitrogênios caracteriza uma amina. Estes alcalóides macrociclos são metabólitos secundários. Dessa forma, os alcalóides ciclopeptídicos podem ser classificados conforme o número de átomos que se encontram neste anel, podendo ser constituído de 13, 14 ou 15 átomos.¹

Esses alcalóides são denominados conforme a planta de origem, onde foram encontrados pela primeira vez. Por exemplo, se for descoberto um novo alcalóide proveniente da *Condalia Buxifolia*, este receberá o nome de condalina.¹

Além dos alcalóides ciclopeptídicos existem também os ciclopeptídeos neutros. Eles poderiam ser produzidos pela planta e armazenados para depois serem transformados nos seus respectivos compostos básicos, ou seriam formados a partir deles, ou ainda poderiam ser produzidos no processo de isolamento.¹

Tanto os alcalóides quanto os ciclopeptídeos neutros são encontrados distribuídos entre as plantas de muitas famílias, como por exemplo: Rhamnaceae, Asteraceae, Celastraceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Pandaceae, Rubiaceae, Sterculiaceae, e Urticaceae;² muitas das quais são usadas na medicina popular, no tratamento de hipertensão, diabetes, infecções bacterianas e fúngicas, e ainda são usadas como sedativos.¹

Na família das Rhamnaceae encontramos o gênero *Scutia Buxifolia* que é uma árvore de pequeno porte, com até 20m de altura, perenifólia e espinesciente, encontrada principalmente no sul da América do Sul. No Brasil ocorre no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e nestes locais, é

conhecida popularmente como coronilha, canela-de-espinho ou espinho-de-touro.³ Dela são extraídos vários alcalóides ciclopeptídicos, principalmente as Scutianinas, que podem ser retiradas de várias partes da planta, como da casca, do caule e da raiz, folhas, flores e sementes, mas a parte onde encontramos sua maior concentração é na casca, tanto do caule como da raiz.

O rendimento destes alcalóides é muito baixo, cerca de 0,01 a 0,09%,¹ o que torna o processo de extração demorado e custoso, além de prejudicar o meio ambiente. Para a sua extração é necessário muitas vezes arrancar a planta, no caso da utilização das raízes, e se for utilizada a casca do caule tem que ser feito de forma bio sustentável (Fig. 1-b), que seria através da retirada de pequenas porções da casca, para que assim não ocorra a morte da planta.



Figura 1. a – *Scutia buxifolia*; b – Caule da *Scutia buxifolia*.

Diante desta situação, torna-se importante a elucidação estrutural dos alcalóides ciclopeptídicos para o estudo da sua atividade biológica, na busca de justificativas que confirmem o seu uso na medicina popular. Dentre os usos na medicina já ficou estabelecida a sua atividade antimicrobiana.

Atualmente a estrutura dos alcalóides ciclopeptídicos pode ser elucidada através da espectrometria de massa (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN), sendo que para alcançar os melhores resultados faz-se uso a espectroscopia bidimensional e cromatografia líquida com fase quiral. Em alguns casos pode ser feita a acetilação dos que contem OH, com a finalidade de obter cristais apropriados para a análise por Raio-X.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Classificação dos Alcalóides Ciclopeptídicos

Alcalóides ciclopeptídicos têm sido isolados de várias espécies de plantas.¹ O termo alcalóide peptídico foi primeiramente proposto por Goutarel et al¹ em 1964, e depois, Tschesche⁴ sugeriu a denominação “alcalóide ciclopeptídico”, como sendo uma designação mais adequada, considerando que essas bases, com única exceção, lasiodina-A,⁵ apresentam um macrociclo em sua estrutura.

Gournelis et al.⁶ (1997) observou que os alcalóides ciclopeptídicos podem ser classificados de acordo com o tamanho do macrociclo, podendo ser de 13-, 14-, ou 15- átomos. Assim, ele é formado por 10, 11 ou 12 átomos que estão interligados através de uma ponte cruzada, nas posições 1,3 ou 1,4 de um anel benzênico.

Este macrociclo é formado por aminoácidos, sendo estes ligados através de ligações peptídicas, e os alcalóides ciclopeptídicos podem ser classificados em outra subdivisão que é em função das unidades de aminoácidos ligadas a este macrociclo. Podem ser 4 ou 5 unidades de aminoácido, se for 4, será A, B, C, e D e se for 5 será A, B, C, D e E, sendo A: um aminoácido terminal básico, B: um β -hidróxi-aminoácido, C: um aminoácido ligado ao anel, D: uma unidade hidróxi-estirilamina e E aparece, às vezes, entre as unidades A e B, é um aminoácido adicional^{3,7} (Fig. 2). Até hoje as scutianinas que foram encontradas possuíam em seu macrociclo, 14 membros.

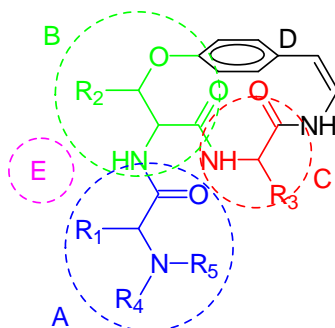


Figura 2. Estrutura geral de alcalóides ciclopeptídicos, proposta por Tschesche.⁴

2.1.1 Alcalóides Ciclopeptídicos de treze membros

A Classe dos alcalóides ciclopeptídicos de treze membros identifica-se pela presença de uma unidade 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina (Fig. 3-a). Outro aspecto importante nesse tipo de alcalóide é o grupamento *trans*-3-hidroxiprolina (Fig. 3-b), presente como hidroxiaminoácido em todos os compostos do gênero.⁴

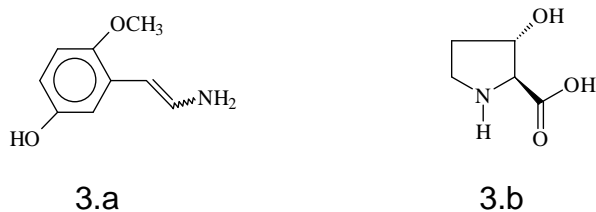


Figura 3. a – 2-metóxi-5-hidróxi-estirilamina; b – *trans*-3-hidroxiprolina.

2.1.2 Alcalóides Ciclopeptídicos de quinze membros

Os alcalóides ciclopeptídicos de quinze membros são caracterizados pela presença da unidade 2-metóxi-5-vinil-fenilalanina (Fig. 4). Um representante típico dessa classe é o alcalóide Mucronina-A isolado de *Ziziphus mucronata*.^{1, 8}

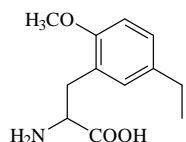


Figura 4. 2-metóxi-5-vinil-fenilalanina.

2.1.3 Alcalóides Ciclopeptídicos de quatorze membros

Os alcalóides ciclopeptídicos que possuem o anel de 14 membros são a classe com o maior número de representantes. As principais características dessas bases são a presença de um β -hidroxiaminoácido (Fig. 5-a) e de uma unidade hidroxiestirilamina (Fig. 5-b).¹

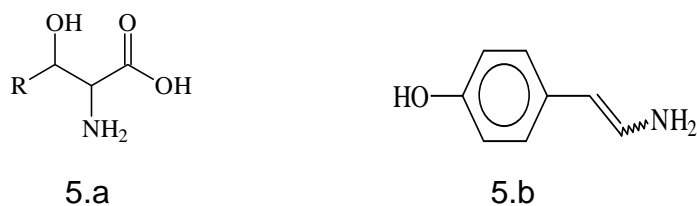


Figura 5. a – β -hidroxiaminoácido; b – hidroxiestirilamina.

Estes alcalóides ciclopeptídicos de catorze membros são divididos em três subgrupos, dependendo do tipo do β -hidroxiaminoácido do anel: β -hidroxileucina, nos alcalóides do tipo Frangulanina,⁹ β -hidroxifenilalanina, nos alcalóides do tipo Nummularina-E,¹⁰ e *trans*-3-hidroxiprolina, nos alcalóides do tipo Mauritina-A.¹¹

Os primeiros relatos sobre a ocorrência desta classe de substâncias na espécie *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamnaceae) foi em 1964, quando Wasicki,¹² observou a presença de alcalóides ciclopeptídicos nesta planta. Porém, um estudo mais aprofundado com esta espécie se deu em 1967, quando um grupo da Universidade de Bonn¹³ trabalhou com a raiz da planta coletada no estado de Santa Catarina, da qual foi isolado um alcalóide ciclopeptídico, a Scutianina-A (Fig. 6).¹³

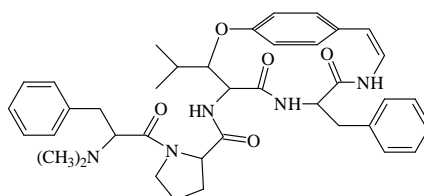


Figura 6. Scutianina-A

A partir da década de setenta, o número de novos alcalóides ciclopeptídicos aumentaram consideravelmente, uma vez que houve um desenvolvimento de técnicas cromatográficas e de métodos de determinação estrutural.¹

Gonzalez et al., trabalharam com a espécie *Scutia buxifolia* coletada na Argentina em 1974. Neste trabalho foram isoladas e determinadas as estruturas de dois novos alcalóides ciclopeptídicos: Scutianina-C, -D e o Scutianeno D.¹⁴

Durante a análise da literatura, levantaram-se algumas dúvidas com relação à estrutura do Scutianeno C e da Scutianina D publicados por Gonzalez. Já que a estrutura referente ao Scutianeno C nos artigos posteriores é denominada como Scutianeno D, e a estrutura da Scutianina D é denominada como Scutianina C.^{14 - 18}

No mesmo ano Tschesche e Ammermann¹⁵ isolaram da raiz da mesma planta, Scutianina-E, um diastereoisômero da Scutianina-D. A estereoquímica da unidade β -hidroxileucina dos diastereoisômeros foi determinada como sendo L-eritro em Scutianina-D e D-eritro em Scutianina-E, e a unidade β -fenilserina como sendo L-treo em Scutianina-D e D-treo em Scutianina-E.¹

Posteriormente em 1977, Tschesche e Hilledrand¹⁶ isolaram da casca do caule de *Scutia buxifolia*, o alcalóide ciclopeptídico Scutianina-G que é outro diastereoisômero da Scutianina-D e -E, e com a continuação de seus trabalhos Tschesche et al.¹⁷ conseguiram isolar e determinar a estrutura da Scutianina-F.

Em 1994 Morel et al.,¹⁸ isolaram pela primeira vez de *Scutia buxifolia*, o alcalóide ciclopeptídico denominado Scutianina-J, sendo que com a continuação dos trabalhos resultou no isolamento e elucidação estrutural de dois novos alcalóides ciclopeptídicos, Scutianina-K e -L, com o auxílio de técnicas como RMN de ¹³C e ¹H e também com RMN 2D.¹⁹

No ano de 2002, Morel et al.²⁰ estudaram outra espécie, também pertencente à família Rhamnaceae, *Condalia buxifolia*, coletada no Rio Grande do Sul, resultando no isolamento de um novo alcalóide ciclopeptídico, Condalina-A, além de três alcalóides já conhecidos, Adoutina-Y, Scutianina-B e Scutianina-C.¹

A Tabela 1 apresenta a estrutura de algumas Scutianinas relativas à molécula da figura 7.²¹

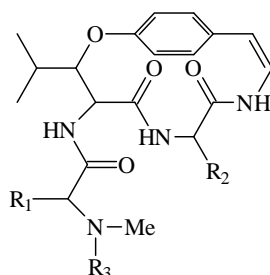


Figura 7. Estrutura das scutianina do tipo Frangulanina.

Tabela 1: Alcalóides ciclopeptídicos de catorze membros do tipo frangulanina.²¹

Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	Ref.
Scutianina B	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	22
Scutianina C	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	15
Scutianina D	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃	15
Scutianina E	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃	15
Scutianina G	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃	17
Scutianina H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃	23
Scutianina J	CH(OH)C ₆ H ₅	CH(OH)C ₆ H ₅	CH ₃	18

A figura 8 traz a estrutura de algumas Scutianinas e a Tabela 2 apresenta as estruturas relativas a esta molécula.²¹

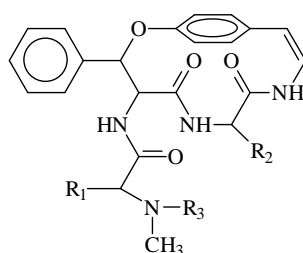
Figura 8. Estrutura das scutianinas do tipo Integerrina.²¹

Tabela 2: Alcalóides ciclopeptídicos de catorze membros do tipo integerrina.

Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	Ref.
Scutianina M	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	3
Scutianina L	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	24

A figura 9 traz a estrutura das scutianinas e a Tabela 3 apresenta as estruturas relativas a esta molécula.²¹

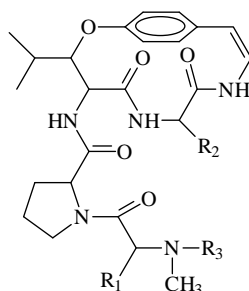


Figura 9. Estrutura das scutianinas do tipo Frangulanina com aminoácido intermediário na posição E.²¹

Tabela 3: Alcalóides ciclopeptídicos de catorze membros do tipo frangulanina com aminoácido intermediário na posição E.²¹

Alcalóide	R ₁	R ₂	R ₃	Ref.
Scutianina A	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	13
Scutianina F	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	H	1

2.1.4 Ciclopeptídeos neutros

Os ciclopeptídeos neutros não apresentam a unidade *N,N*-dimetilamina em sua estrutura em analogia aos alcalóides ciclopeptídicos. Analisando os poucos trabalhos sobre o assunto, observamos várias divergências sobre sua classificação.

As estruturas desses metabólitos foram publicadas como ciclopeptídeos neutros por não apresentarem o grupo básico que caracteriza o alcalóide. Recentemente, alguns periódicos reconhecem estas estruturas como sendo alcalóides por serem obtidos na biossíntese de aminoácidos.²¹

Os ciclopeptídeos neutros poderiam ser formados através de uma reação de eliminação na unidade A da estrutura do alcalóide (ver Fig. 2).

Os hidróxidos de amônio quaternário, onde um dos grupos substituintes do átomo de nitrogênio tem um hidrogênio β, podem ser decompostos através de aquecimento, conhecido desde 1851, por reação de eliminação de Hofmann, onde há formação de uma amina terciária e de uma olefina respectivamente.²⁵

Devido à estrutura das scutianinas, na eliminação de Hofmann, (somente é possível nos alcalóides *N,N*-dimetilados) existe a possibilidade de

formar um único produto, já que na estrutura das scutianinas encontramos apenas um hidrogênio β em relação à unidade *N,N*-dimetilamina, sendo que na outra posição β em relação à amina, encontramos uma carbonila.

Até o momento foi identificado da *Scutia buxifolia*, um único ciclopeptídeo neutro conhecido como Scutianeno D¹ (Fig. 10). Portanto, ainda não existem estudos suficientes para saber como ocorre sua biossíntese, se a formação do ciclopeptídeo neutro ocorre paralelamente à formação do alcalóide ciclopeptídeo, ou se algum deles é formado através do outro, ou se ainda sua formação ocorre durante o processo de isolamento. Da *Discaria americana* vem sendo isolados vários ciclopeptídeos neutros, o que pode levar a uma maior compreensão da rota biossintética dos mesmos.²⁶

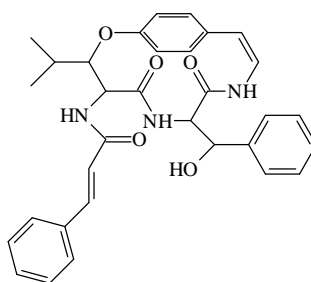


Figura 10. Scutianeno D.¹

A estrutura acima, proposta por Maldaner¹ difere da publicada anteriormente por Gonzalez Sierra¹⁴ que ele denominou de Scutianeno C.

2.2 Estereoquímica

Isômeros são compostos que apresentam a mesma fórmula química, porém estruturas diferentes, sendo assim, formam moléculas distintas.

Existem vários tipos de isomeria, dentre elas a de posição, onde a mesma fórmula molecular pode representar estruturas diferentes. Um outro tipo é a isomeria óptica, que é de interesse para o nosso estudo por ter influência na atividade biológica.

Uma molécula é denominada quiral quando sua imagem especular não se sobrepõe em si mesma, ou seja não possui plano de simetria. Desta forma, ela origina dois enantiômeros. Estes enantiômeros são muito importantes para a química orgânica, em especial para a produção de fármacos, já que eles

podem possuir funções específicas em nosso organismo. Já foi descrito na literatura que de um dado par de enantiômeros cada um deles pode ter atividades biológicas distintas e até opostas.²⁷

Estudos da relação estrutura/atividade mostram que para um determinado substrato somente um arranjo espacial da molécula testada vai apresentar a atividade desejada. Isto pode ser explicado por vários modelos, sendo um deles conhecido como chave/fechadura.²⁸

Considerando que a quiralidade está presente em nosso corpo, e a maioria de nossas moléculas são quirais, é de extrema importância.

A utilização de um solvente quiral, ou um “reagente de deslocamento quiral”, na espectroscopia de RMN, é útil para identificar sinais de enantiômeros que antes estariam sobrepostos, já que a interação da molécula quiral introduzida no meio, leva a formação de diastereoisômeros que agora são distinguíveis por RMN.²⁹

Outra maneira para identificarmos enantiômeros é através de cromatografia com gás ou cromatografia líquida de alta eficiência com colunas quirais.²⁹

As fases quirais são materiais que, quando empregados como fases estacionárias ou introduzidos na fase móvel, permitem a separação de enantiômeros de misturas racêmicas.³⁰

2.2.1. Técnicas de RMN para determinação da estereoquímica

Conforme mencionado na introdução deste trabalho, as técnicas de RMN podem ser muito importantes no auxílio da elucidação estrutural das Scutianinas, sendo que os espectrômetros mais utilizados são os denominados aparelhos de pulso com transformada de Fourier.³¹

Com a utilização do espectro de RMN de ^1H é possível determinar quais H estão acoplando entre si, podemos saber quantos H temos na vizinhança de cada um deles. Através desta técnica podemos determinar a constante de acoplamento (J), e com ela diferenciar, por exemplo, as olefinas E (*trans*) e Z (*cis*) e em açúcares a posição relativas das ligações glicosídicas (anômeros α e β).

Através do RMN de ^{13}C podem ser identificados os sinais referentes a todos os carbonos presentes na molécula. Assim podemos determinar a quantidade de carbonos na molécula. Com esta técnica também podemos diferenciar os C sp^3 , sp^2 e sp , quando eles apresentam deslocamentos químicos característicos.

Em caso de dúvida quanto ao número de hidrogênios ligados a cada carbono a técnica DEPT que fornece 3 subespectros separados, que permite identificar os sinais de CH_3 , CH_2 e CH . Os sinais dos carbonos sem hidrogênio do espectro de ^{13}C são identificados pela sua ausência nos espectros de DEPT.

Considera-se na interpretação dos espectros ^1H - ^1H COSY que os picos fora da diagonal, ou picos cruzados, têm origem na interação via ligação química entre hidrogênios vizinhos, mesmo quando a sua magnitude ($^nJ_{\text{H-H}}$ [Hz]) não é observável no espectro de ^1H .

No espectro NOESY é possível observar interações entre hidrogênios próximos espacialmente (até 4-5 Å). A ausência de picos de cruzamento não exclui a possibilidade de estarem ocupando uma mesma região da molécula, pois a distância entre esses núcleos excede ao alcance desta técnica.

No espectro HSQC é possível observar acoplamentos carbono/hidrogênio a uma ligação, através disto pode-se complementar a atribuição dos sinais dos respectivos espectros de 1D.²⁹

3. Objetivos:

Completar o banco de dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da Scutianinas C e do Scutianeno D com a finalidade de estabelecer relações entre estes e as respectivas estruturas.

Estabelecer a estereoquímica relativa dos centros quirais destes compostos através da análise de espectros NOESY.

4. Parte Experimental

4.1. Scutianina e Scutianeno:

As amostras foram cedidas pelo laboratório do Professor Ademir Morel da UFSM (Universidade Federal de Santa Maria), sendo estas coletadas no sítio do próprio Professor, localizado no interior de Santana do Livramento no Rio Grande do Sul.

4.1.1. Medidas de RMN:

Os espectros dos compostos scutianínicos foram medidos em espectrômetro de RMN Varian Mercury Plus AS-400 (Central de Análises do Departamento de Química da UFSC), e no espectrômetro de RMN Bruker DPX400 e processados no *software* XwinNmr1.3 da Bruker (Departamento de Química da UFSM).

As frequências de observação para os espectros de ^1H e ^{13}C foram de 400,1 MHz e 100,32 MHz respectivamente, nas seguintes condições: as amostras estudadas foram preparadas em solução de clorofórmio deuterado e DMSO deuterado, em concentração variável de acordo com a quantidade de amostra, sendo que em alguns casos chegou ao mínimo de 0,018 mmolar não ultrapassando de 0,040 mmolar, para ^1H e ^{13}C , utilizando-se TMS (0,05% v/v) como referência interna em tubos de 5 mm de diâmetro.

4.1.1.1. Espectros de RMN de ^1H : Com 32 varreduras, pulso de observação de 45 graus e tempo entre pulsos de 1 s. Os interferogramas foram obtidos com 308,2 K de memória.

4.1.1.2. Espectros de RMN de ^{13}C /DEPT: Com 24648 varreduras (^{13}C) e 3893 varreduras (DEPT), pulso de observação de 45 graus e tempo entre pulsos de 1 s. Os interferogramas foram obtidos com 65 K de memória de transformadas com um fator de largura de linha de 1 Hz.

4.1.2.3. Espectros de RMN 2D:

COSY (UFSM): Número de incrementos = 128

Número de varreduras/ incremento = 4

(UFSC): Número de incrementos = 200

Número de varreduras/ incremento = 4

NOESY (UFSM): Número de incrementos = 256

Número de varreduras/ incremento = 4

Tempo de mistura: não indicado

(UFSC): Número de incrementos = 200

Número de varreduras/ incremento = 4

Tempo de mistura: 200 msegundos

HSQC (UFSM): Número de incrementos = 256

Número de varreduras/ incremento = 8

(UFSC): Número de incrementos = 200

Número de varreduras/ incremento = 16

5. Resultados e discussão

5.1. Scutianeno D.

Estrutura referente ao Scutianeno D (Fig. 11).

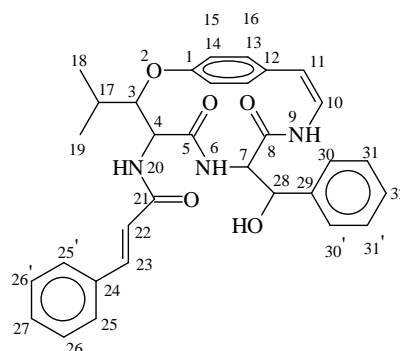


Figura 11. Scutianeno D numerado.

5.1.1. RMN de ^1H

Na figura 12 podemos observar o espectro de RMN de ^1H , onde é possível visualizar os sinais dos diferentes tipos de hidrogênios da molécula.

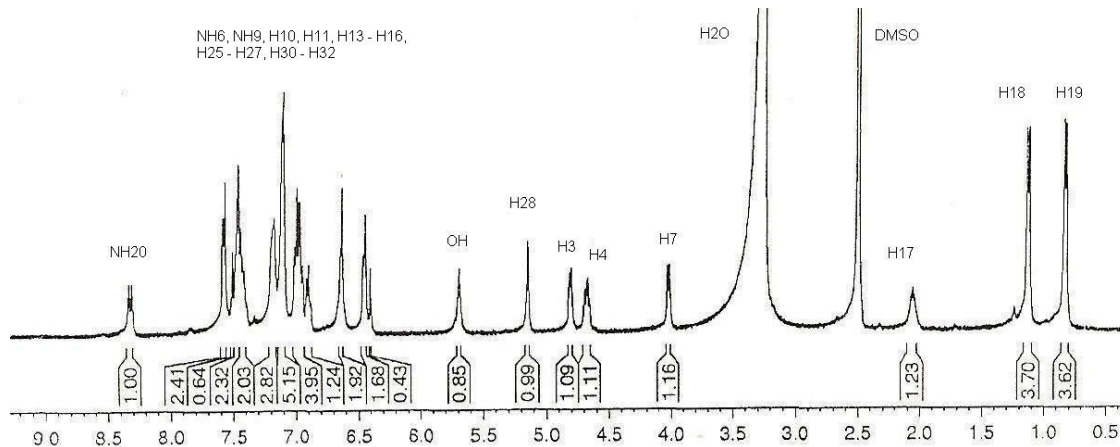


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H do Scutianeno D, em DMSO.

Os sinais das metilas 18 e 19 aparecem na forma de dois dubletes em 1,12 e 0,82 ppm respectivamente, o que evidencia uma restrição na rotação do grupo isopropil. Em 2,05 aparece o H17, na forma de multiplete, devido ao seu acoplamento com as metilas e o H3.

Os sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 7 e 28, que são carbonos quirais, aparecem em 4,80; 4,67; 3,92 e 5,15 ppm,

respectivamente. Os desdobramentos e as constantes de acoplamento observados nestes sinais são importantes na análise da estrutura do macrociclo.

Através do RMN de ^1H pode ser observada uma alteração na configuração relativa da estereoquímica do $\beta\text{-OH}$ aminoácido, no caso dele ser eritro, terá $J_{\alpha,\beta}$ ca. 8 Hz, e no caso de ser treó, terá $J_{\alpha,\beta}$ ca. 2 Hz. Desta forma como o H- α possui $J = 8,88\text{Hz}$ e o H- β possui $J = 6,36\text{Hz}$ a configuração relativa do $\beta\text{-OH}$ aminoácido é eritro.

Na figura 13 podemos observar uma região expandida do espectro de RMN de ^1H , sendo esta importante para identificar os sinais das olefinas.

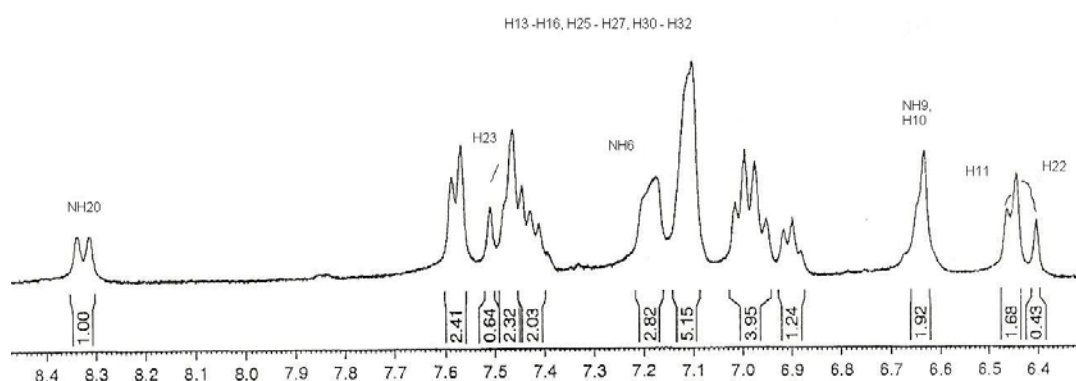


Figura 13. Espectro expandindo de RMN de ^1H , região entre 6,3-8,5 ppm do Scutianeno D, em DMSO.

Os sinais dos hidrogênios lábeis (OH e NH) aparecem na região de 5,15 até 8,32. Sendo que o OH aparece em 5,69, NH9 6,65, NH6 7,19 e o sinal em 8,32 corresponde ao N-H20 o que foi confirmado com o acoplamento que aparece no espectro de COSY com C4.

Entre aproximadamente 6,40 e 7,60 ppm encontram-se os H aromáticos e os olefínicos. Os sinais correspondentes a uma olefina *E* (*trans*) são observados H22 6,42 ppm e H23 7,49 ppm ($J = 16,4\text{ Hz}$), sendo que isto a diferencia da olefina *Z* (*cis*) da unidade estilamina (H10 6,64 ppm e H11 6,45 ppm e $J=7,2\text{ Hz}$).

Através do espectro de RMN ^1H podemos identificar que o composto em questão é um ciclopeptídeo neutro e não um alcalóide ciclopeptídeo. No composto neutro não encontramos os sinais dos hidrogênios das metilas ligadas ao nitrogênio da amina (aproximadamente 2,2 ppm), e há o

aparecimento dos sinais de uma olefina *E* (*trans*). Foi possível determinar a estereoquímica das olefinas, através da constante de acoplamento. A olefina do C10 possui $J = 7,2$ Hz, com isso, pode se ter a certeza que esta é uma olefina *Z* (*cis*), já a olefina do C22 possui $J = 16,4$ Hz, o que identifica uma olefina *E* (*trans*).

5.1.2. RMN de ^{13}C

A figura 14 é o espectro de RMN de ^{13}C , onde é possível identificar os sinais dos carbonos do Scutianeno D.

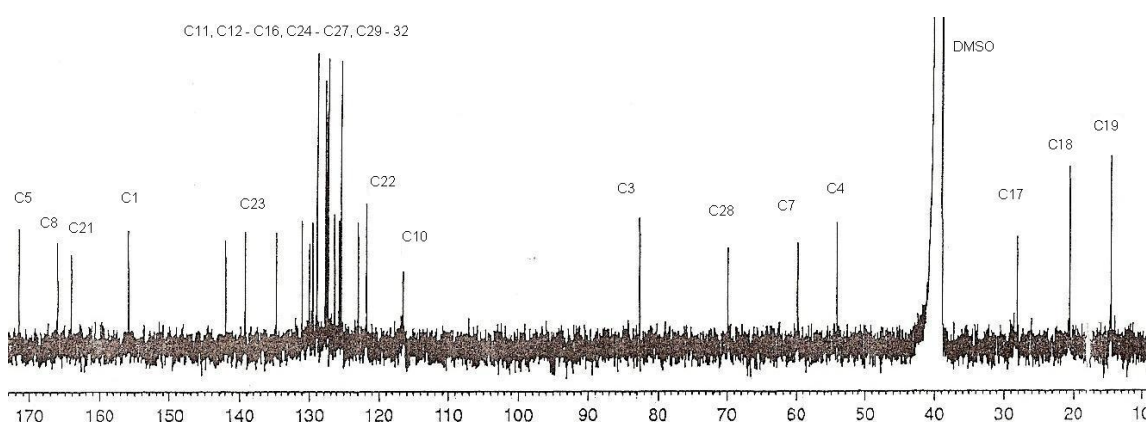


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C do Scutianeno D, em DMSO.

O Scutianeno D possui 32 carbonos sendo que 25 deles são sp^2 e o restante sp^3 .

De maneira geral os carbonos com hibridização sp^3 apresentam seus sinais entre 0 e 100 ppm, os com hibridização sp^2 têm seus sinais entre 120 e 240 ppm, sendo que os dos anéis aromáticos aparecem entre 120 e 160 ppm e as olefinas têm seus sinais entre 100 e 120 ppm, os sinais das carbonilas aparecem entre 160 e 240 ppm.

Desta forma os sinais correspondentes aos carbonos sp^3 estão distribuídos da seguinte maneira: as metilas em 14,5 e 20,5 ppm, e o C17 em 28,1 ppm. Em 54,1 ppm encontramos o sinal do C4; em 59,8 ppm o C7; em 69,8 ppm o C28 e finalmente em 82,6 ppm o C3.

Com o RMN de ^{13}C a configuração relativa do $\beta\text{-OH}$ aminoácido, no caso do C- β possuir configuração D-eritro, ele terá o seu deslocamento entre 86 – 88 ppm e se a configuração for L-eritro terá o seu deslocamento entre 78 – 83 ppm.

ppm. No caso do C- α possuir configuração D-eritro, ele terá o seu deslocamento em 53,8 ppm e a configuração for L-eritro terá o seu deslocamento em 55 ppm.⁶

A configuração relativa em relação ao C- β (C3) é L-eritro, já que este apresenta o sinal em 82,6 ppm, e em relação ao C- α (C4) não é possível definir, pois os valores que diferenciam o D-eritro e o L-eritro são muito próximos.

Na figura 15 podemos observar os sinais referentes aos carbonos com hibridização sp^2 .

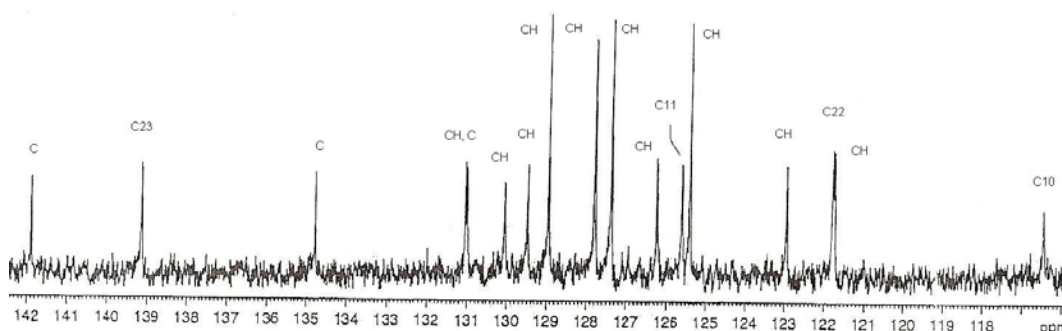


Figura 15. Espectro expandindo de RMN de ^{13}C , região entre 115,8-142,4 ppm do Scutianeno D, em DMSO.

Em 116,4 aparece o sinal do C10. Os sinais que são encontrados aproximadamente entre 121,7 e 155,8 ppm correspondem aos anéis aromáticos e às olefinas, sendo que entre estes estão os C22 em 121,7 ppm, C11 em 125,6 ppm, e o C23 em 139,1 ppm, que pertencem as olefinas. Os sinais dos carbonos aromáticos que não estão ligados a hidrogênios aparecem em 131,0; 134,8; 141,9 e 155,8 ppm, onde o último corresponde ao C1, já que este, está ligado diretamente a um oxigênio.

Os sinais correspondentes as carbonilas 21, 8 e 5, estão em 164,0; 165,9 e 171,5 ppm respectivamente (HSQC).

5.1.3. DEPT

No DEPT-135, referente ao scutianeno D, não encontramos sinais de CH_2 (Fig. 16), pois nesta molécula não existe carbono ligado a dois hidrogênios.

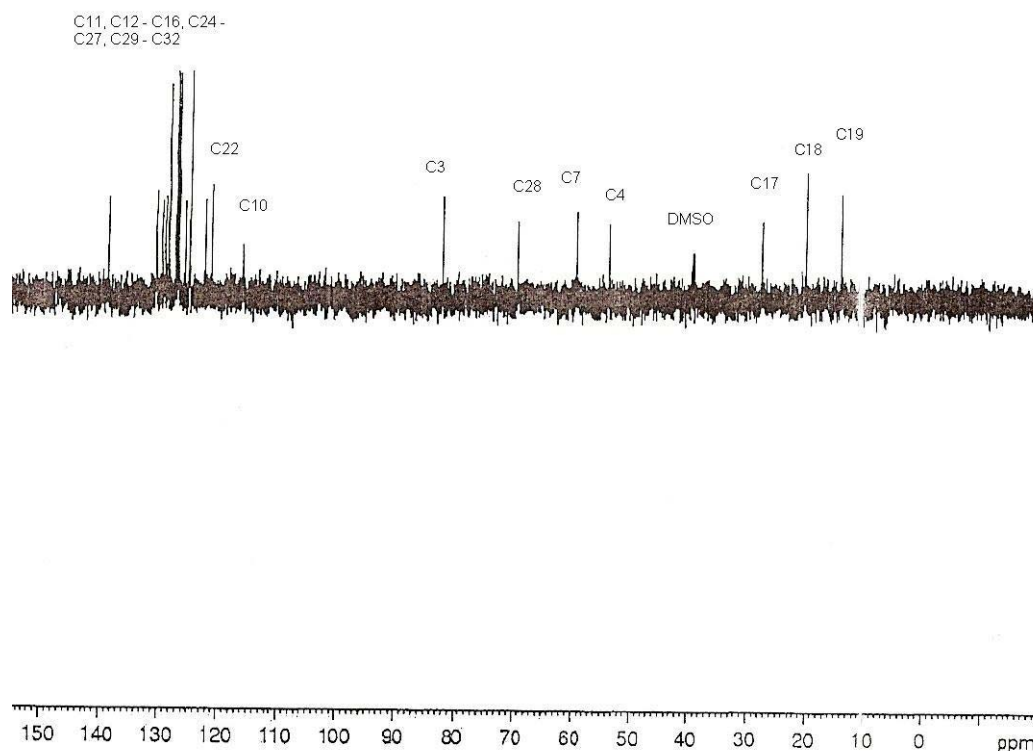


Figura 16. Espectro de ^{13}C DEPT 135° , do Scutianeno D, em DMSO.

5.1.4. COSY

Com o auxílio da técnica de RMN 2D, COSY (Fig. 17) podemos ter certeza de alguns dados que foram mencionados no RMN ^1H . Este método pode verificar a presença de acoplamentos entre os hidrogênios próximos, mesmo quando no espectro 1D o desdobramento não é visível.

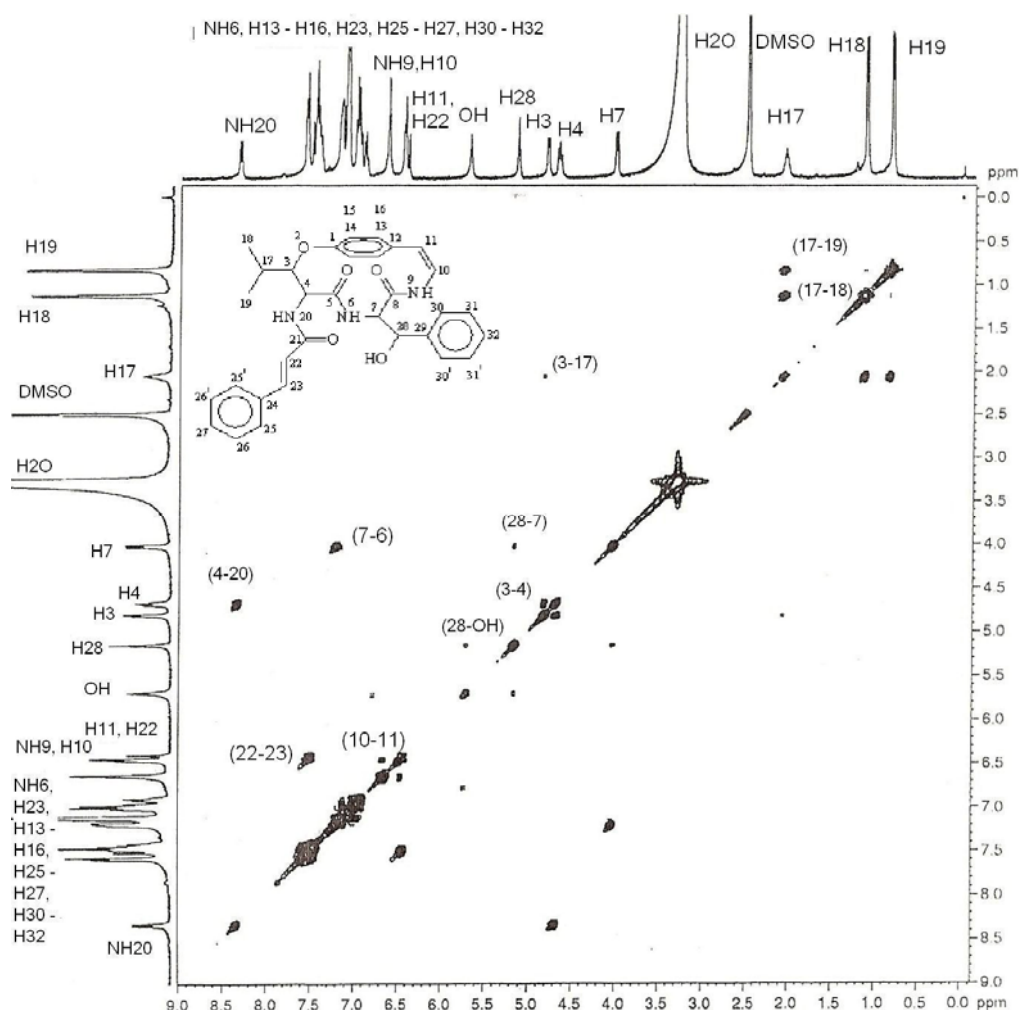


Figura 17. Espectro de RMN de 2D, COSY, do Scutianeno D, em DMSO, a 400.13 MHz.

Dessa forma, podemos confirmar que os sinais encontrados em 0,82 e 1,12 ppm correspondem aos H19 e H18, já que eles acoplam com o sinal em 2,05 ppm (H17), e este apresenta interação com os mesmos e com o H3, em 4,81 ppm. Logo, o hidrogênio que tem seu sinal em 4,67 ppm corresponde ao H4, já que este, está acoplado com o H3. Também podemos confirmar que o sinal mais desblindado corresponde ao NH20, já que este só pode acoplar com o H4.

Em outra parte da molécula pode ser visualizado o acoplamento do H7 (4,02 ppm) com o H28 (5,15 ppm) e H7 com o NH6 (7,19 ppm). No mesmo fragmento aparece o acoplamento entre o H28 e o OH (5,69 ppm).

Na região entre 6,2 e 7,7 ppm é possível identificar o acoplamento entre o H10 e H11, e entre o H22 e H23, que já haviam sido identificados no espectro de RMN ^1H .

5.1.5. HSQC

No HSQC (Fig. 18) os sinais de cruzamento relacionam os hidrogênios aos carbonos aos quais estão ligados.

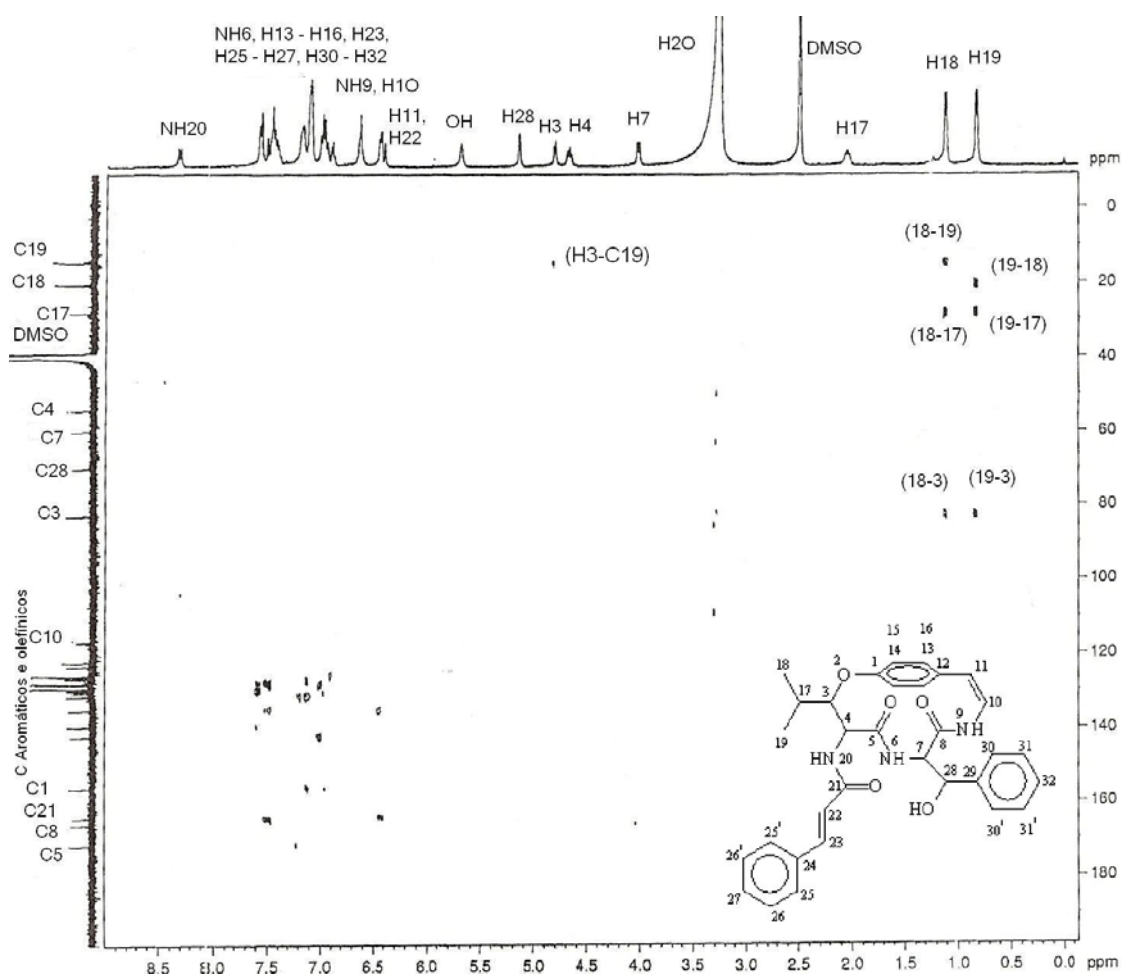


Figura 18. Espectro de RMN de 2D, HSQC, do Scutianeno D, em DMSO, a 400.13 MHz.

Desta forma os sinais que aparecem em 155,8; 164,0; 165,9 e 171,5 correspondem a carbonos que não possuem hidrogênios ligados a eles, isto quer dizer que os 3 sinais mais altos são de carbonilas, e o mais baixo deve ser o carbono 1, já que este, está ligado a um oxigênio, e desta forma ele aparece mais desblindado.

Podemos encontrar outros 3 carbonos que não estão ligados a hidrogênio, e estes correspondem aos anéis aromáticos.

Como este experimento também serve para confirmar os sinais referentes aos grupamentos N-H e O-H, já que estes só irão aparecer no espectro de hidrogênio e não aparecerão no espectro de carbono. Portanto, podemos confirmar que o sinal que aparece em 8,32 ppm corresponde ao N-H 20, pois não ocorre o seu acoplamento com nenhum carbono. Assim aquele que aparece em 5,69 ppm é proveniente do grupo O-H ligado ao carbono 30, já que este não possui um sinal correspondente no espectro de ^{13}C . Os outros dois sinais de N-H se confundem com os hidrogênios aromáticos e olefínicos, o que dificulta um pouco a visualização de seu acoplamento com os carbonos correspondentes.

5.1.6. NOESY

No espectro NOESY (Fig. 19) é possível observar a proximidade espacial de alguns hidrogênios especialmente os ligados a carbonos integrantes do macrociclo.

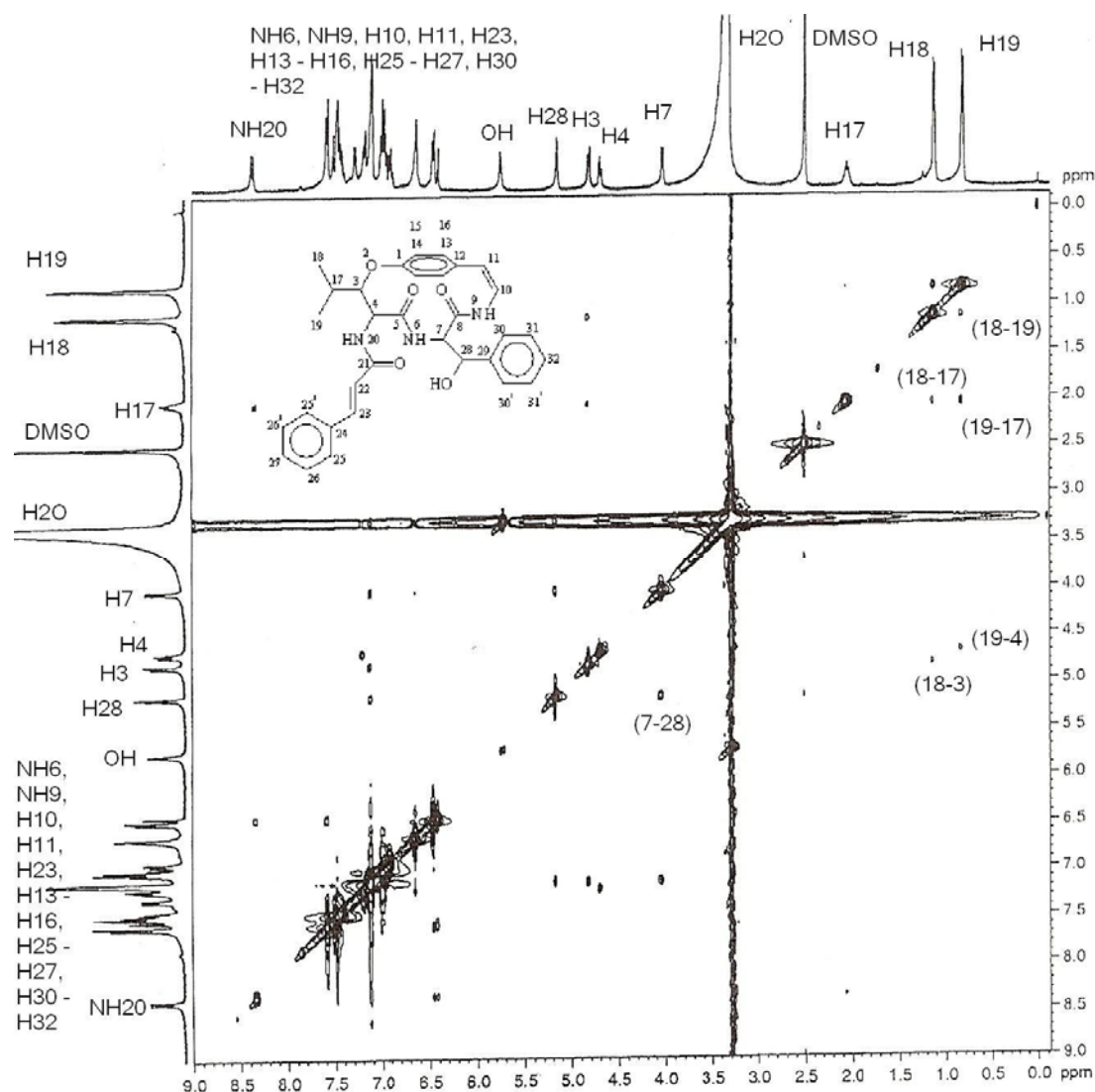


Figura 19. Espectro de RMN de 2D, NOESY, do Scutianeno D, em DMSO, a 400.13 MHz.

Sendo assim, podemos observar que os hidrogênios dos carbonos 3 e 4 não acoplam entre si, já que os mesmos não apresentam sinais de interação no espectro NOESY, desta forma possivelmente eles encontram-se de lados opostos da molécula, ou se estivessem do mesmo lado eles estariam a uma distância maior que 5 Å. Entre os hidrogênios dos carbonos 7 e 29 existe acoplamento, com isso podemos observar que os dois devem estar do mesmo lado da molécula.

Os hidrogênios nas posições 18 e 19 estão acoplando com os das posições 3 e 4 respectivamente, isto serve para confirmar que os hidrogênios das posições 3 e 4 estão em lados opostos da molécula.

A estrutura do composto neutro analisado mostrou-se similar a Scutianina D, e não a C, como mencionada por Gonzalez.¹⁴ Isto pode ser comprovado através das similaridades estruturais entre o Scutianeno D e a Scutianina D¹⁵ (Ver Fig. 7, Tabela 1). Como, por exemplo, a presença de uma hidroxila ligada ao carbono 28 do Scutianeno D; maior quantidade de carbonos sp², já que no composto D encontramos 3 anéis aromáticos, enquanto no composto C temos apenas 2 anéis aromáticos; e não encontramos sinais de referentes a CH₂.

Isto pode ser evidenciado através da comparação de alguns dados de RMN de ¹³C da Scutianina D e do Scutianeno D (Tabela 4), onde observa-se similaridades entre os sinais.

Tabela 4: Dados de RMN de ¹³C do Scutianeno D e da Scutianina D¹⁵.

	C1	C3	C4	C5	C7	C8	C17
Alcalóide/ Neutro							
Scutianina D	155.80	81.40	55.10	171.80	57.90	166.80	29.00
Scutianeno D	155.80	82.60	54.10	171.50	59.80	165.90	28.10

5.2. Scutianina C

Estrutura referente à Scutianina C (Fig. 20).

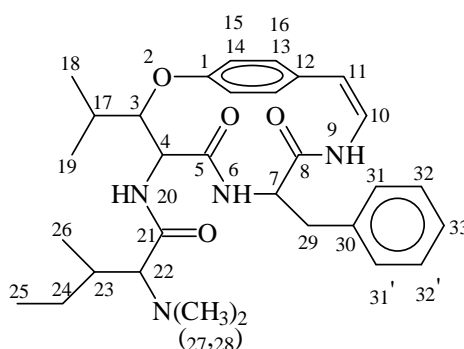


Figura 20. Scutianina C.

5.2.1. RMN de ¹H

Na figura 21 podemos observar o espectro de RMN de ¹H, onde é possível visualizar os sinais dos diferentes tipos de hidrogênios da molécula.

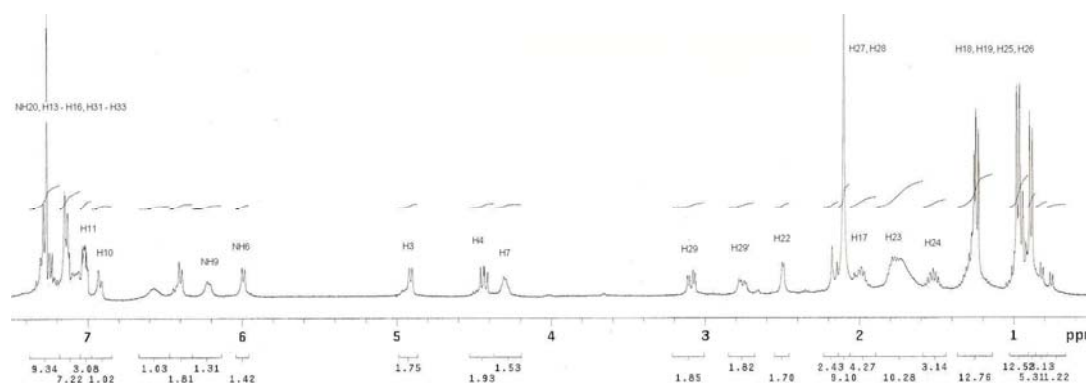


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H da Scutianina C, em CDCl_3 .

Os sinais das metilas H18, H19, H25 e H26 aparecem entre 0,80 e 1,30 ppm. O H24 em 1,52 ppm; o H29 e H29' aparecem em 3,1 ppm e 2,76 ppm por serem diastereotópicos; o H23 em 1,78 ppm; o H17 em 2,00 ppm; H28 e H29 em 2,20 ppm e o H22 em 2,49 ppm.

Em 4,29 ppm encontramos o H7; em 4,34 ppm aparece o H4 e em 4,91 ppm o H3, em 5,99 ppm o NH6, em 6,23 ppm o NH9 e em 7,13 ppm o NH20.

Os sinais dos hidrogênios aromáticos estão entre 6,90 e 7,40 ppm, e os sinais dos H10 e H11 pertencentes à olefina encontram-se em 6,92 e 6,39 ppm, respectivamente.

5.2.2. RMN ^{13}C

A figura 22 é o espectro de RMN de ^{13}C , onde é possível identificar os sinais dos carbonos da Scutianina C.

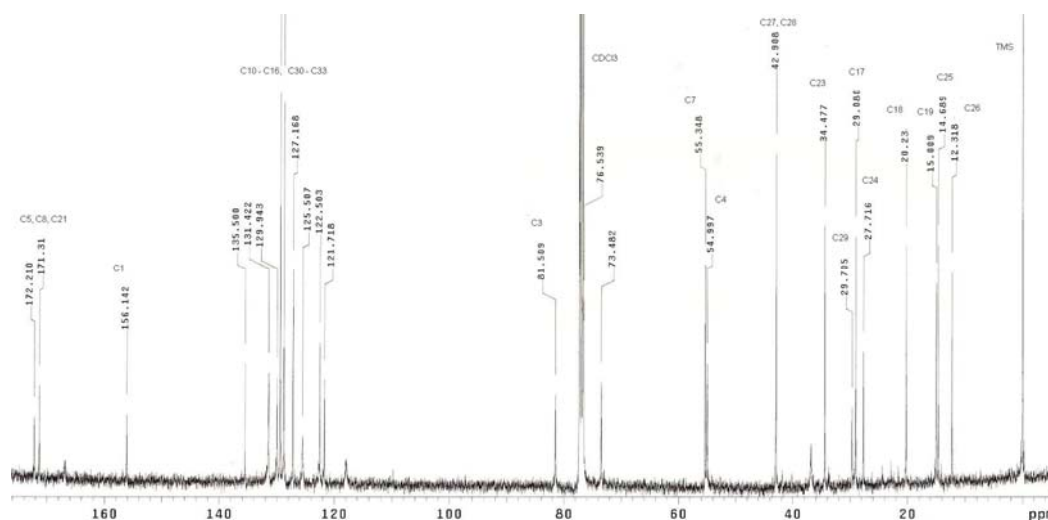


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C da Scutianina C, em CDCl_3 .

A Scutianina C possui 31 carbonos sendo que 17 deles são sp^2 e o restante é sp^3 .

Desta forma, os sinais correspondentes aos carbonos sp^3 estão distribuídos da seguinte maneira: o C18 em 20,24 ppm; o C19 em 15,01 ppm; o C26 em 12,32 ppm; o C25 em 14,69 ppm; o C24 em 27,72 ppm; o C17 em 29,08 ppm; o C29 em 29,70 ppm; o C23 em 34,48 ppm; os C27 e C28 possuem seus sinais sobrepostos em 42,91 ppm; o C4 em 55,00 ppm; o C7 em 55,35 ppm e finalmente em 81,51 ppm o C3.

Os sinais entre 118,00 ppm e 156,14 ppm correspondem às olefinas e aos carbonos aromáticos, sendo que o sinal do C10 aparece em 131,42 ppm e o C1 em 156,14 ppm, já que este está ligado diretamente em um oxigênio.

Os sinais correspondentes às carbonilas 5, 8 e 21 estão em 167,00; 171,3 e 172,2 ppm.

5.2.3. DEPT

No espectro DEPT (Fig. 23), confirma-se a existência de 6 metilas na molécula, dentre elas as metilas 27 e 28 pertencentes à *N,N*-dimetilamina confirmando o composto como sendo um alcalóide, sendo as outras 4 C18, C19, C25, C26.

Também foi possível confirmar a presença de dois grupos CH_2 C24 e C29.

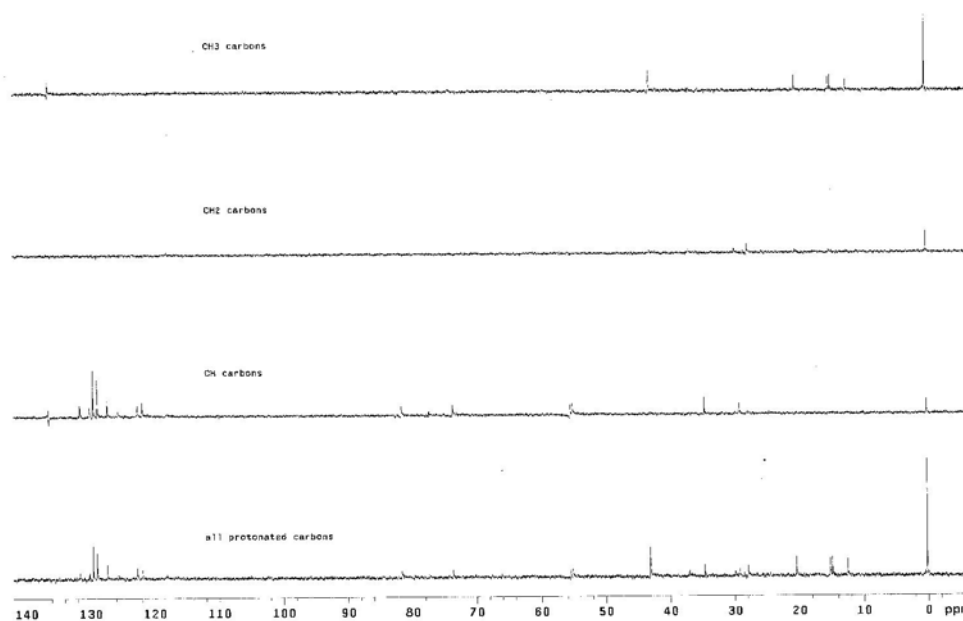


Figura 23. Espectros parciais de ^{13}C DEPT, da Scutianina C, em CDCl_3 .

5.2.4. COSY

Com o auxílio da técnica de RMN 2D, COSY (Fig. 24) podemos ter certeza de alguns dados que foram mencionados no RMN ^1H .

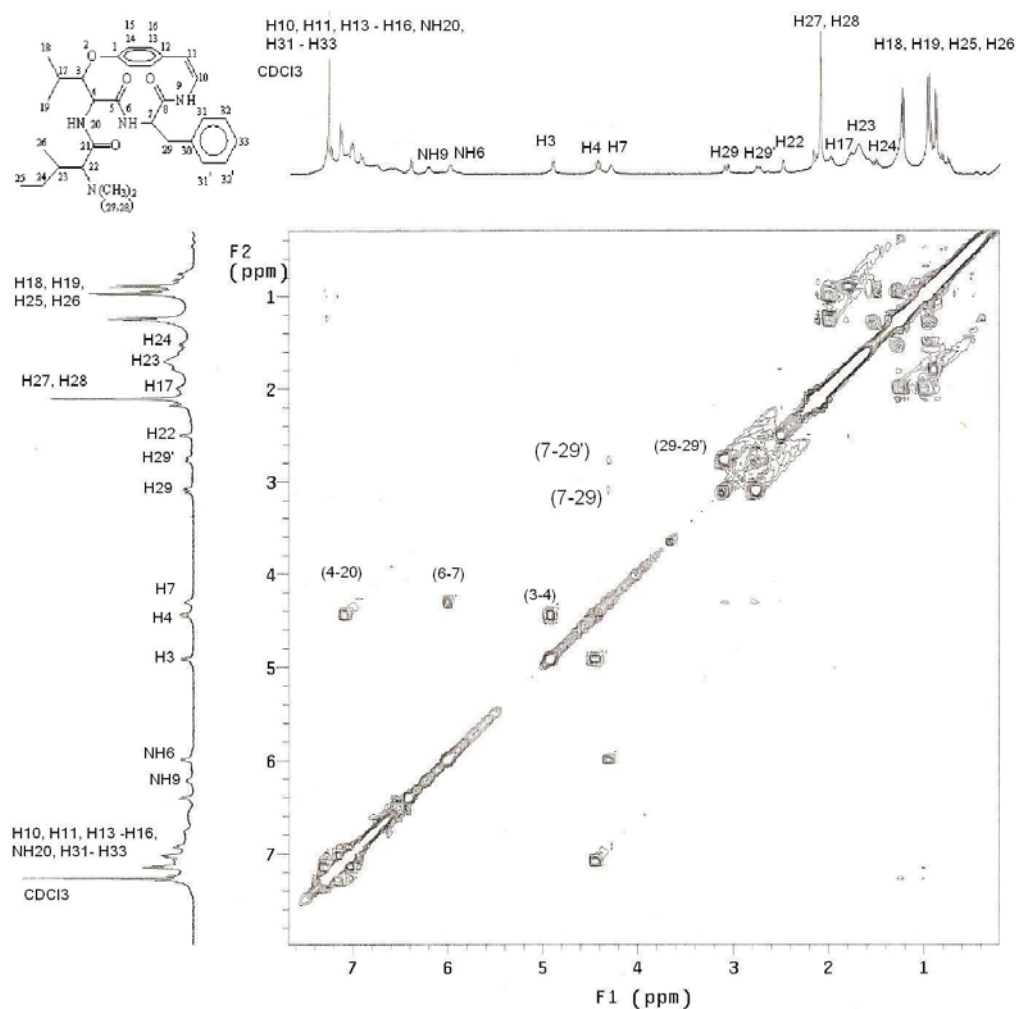


Figura 24. Espectro de RMN de 2D, COSY, da Scutianina C, em CDCl₃, a 400.13 MHz.

Dessa maneira, podemos confirmar que o sinal em 4,29 ppm corresponde ao H7, já que este acopla com o sinal em 5,98 ppm (NH6). O sinal em 4,91 ppm é referente ao H3 que acopla com o H4 e tem seu sinal em 4,34 ppm, e este acopla com o NH20 em 7,13 ppm.

5.2.5. HSQC

Na figura 25 podemos observar o HSQC da Scutianina C.

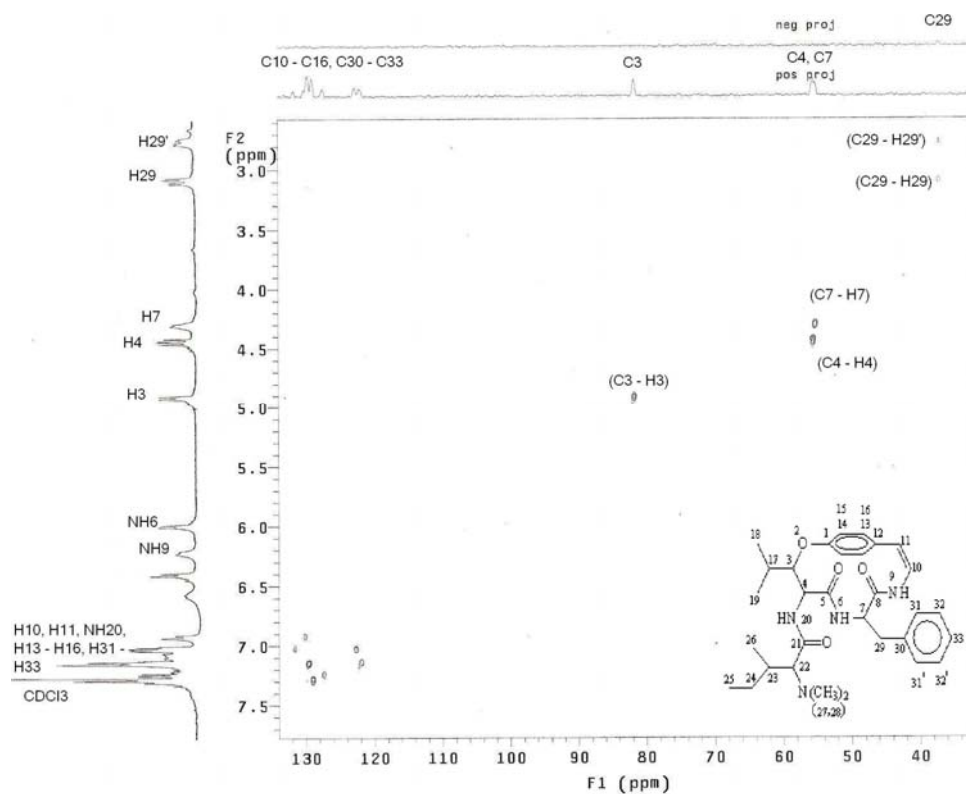


Figura 25. Espectro de RMN de 2D, HSQC, da Scutianina C, em CDCl_3 , a 400.13 MHz.

Os sinais que aparecem em 156,1; 167,00 171,3 e 172,2 ppm correspondem a carbonos que não possuem hidrogênios ligados a eles, isto quer dizer que os 3 sinais mais altos são de carbonilas, e o mais baixo deve ser o carbono 1, já que este está ligado a um oxigênio, e desta forma ele aparece mais desblindado.

5.2.6. NOESY

Na figura 26 podemos observar espectro de NOESY, da Scutianina C.

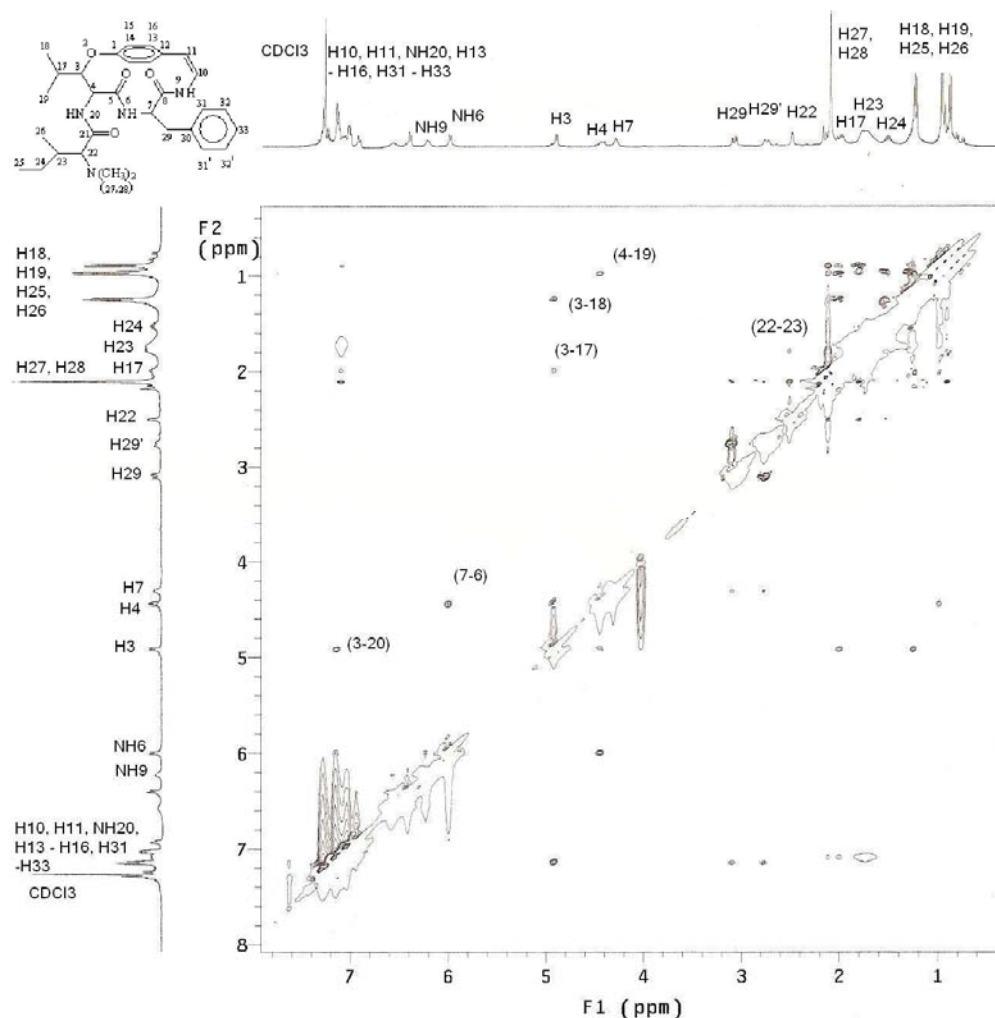


Figura 26. Espectro de RMN de 2D, NOESY, da Scutianina C, em CDCl₃, a 400.13 MHz.

Podemos observar que os hidrogênios dos carbonos 3 e 4 não apresentam acoplamento, pois os sinais visíveis não apresentam simetria em relação à diagonal (característica dos espectros de COSY e NOESY) sendo assim estes H podem estar em opostos na molécula (ver discussão do NOESY do Scutianeno D). Isto é confirmado com o acoplamento do H18 com o H4, e do H19 com o H3, e esta interação não ocorre entre o H19 e o H4, e o H18 com o H3.

6. Conclusão

Com os resultados obtidos nas análises dos espectros de RMN 1D e 2D do Scutianeno D, foi possível determinar a configuração relativa da estereoquímica dos centros de quiralidade desta molécula, e também das olefinas dos C10 e C22.

Sendo assim o C3 e o C4 podem ter sua configuração relativa R/R ou S/S, o que evidencia uma das limitações do estudo de estereoquímica através dos espectros de RMN.

Os outros dois carbonos quirais (7 e 28) possuem a configuração relativa R/S ou S/R, já que o espectro NOESY evidencia que os hidrogênios estão do mesmo lado da molécula.

Em relação a Scutianina C foram obtidos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C não mencionados na literatura.

A análise do espectro de RMN NOESY auxiliou na determinação da configuração relativa C3 e C4, que podem ter sua configuração relativa R/R ou S/S.

Nesta molécula foi possível determinar a estereoquímica dos C22 e C23 através de NOESY, no qual apresentaram sinais de cruzamento, fornecendo as possibilidades R/S e S/R respectivamente.

A estrutura do composto neutro analisado mostrou-se similar a Scutianina D, e não a C, como mencionada por Gonzalez Sierra.¹⁴

7. Bibliografia

- 1 – MALDANER, G. **Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas. Tese (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS, 2005.**
- 2 – PAIS, M., MONSEUR, X., LUSINCHI X., and GOUTAREL, R., Bull. Soc. Chim. France 817. **1964.**
- 3 – CALGAROTO, N. S., TATSCH, R., SILVA DA, A. C. F., PARANHOS, J. T., Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 357-359, jul. **2007.**
- 4 – TSCHESCHE, R. and KAUSSMAN, E. U., The Alkaloids, Vol. 15, *Manske Academic Press*, New York, N. Y., 165-205, **1975.**
- 5 – MARCHAND, J., PAIS, M., MOUSEUR, X; and JARREAU, F. X., *Tetrahedron*, 25, 937, **1969.**
- 6 – GOURNELIS, D. C., LASKARIS, G. G., VERPOORTE, R. **Cyclopeptide alkaloids, Natural Product Reports**, 75 - 82, **1985.**
- 7 – EL-SEEDI, H. R., ZAHRA, M. H., GORANSSON, U., VERPOORTE, R., Cyclopeptide alkaloids. *Phytochem Rev* 6: 143–165, **2007.**
- 8 – TSCHESCHE, R., DAVID, S. T., ZERBES, R., RADLOFF, M. V. KAUSSMANN, E. U., and ECKHADT, G., *Liebigs Ann. Chem.*, 1915, **1974.**
- 9 – TSCHESCHE, R. Und Last, H. *Tetrahedron*, (25), 1993-1998. **1968.**
- 10 – GEHRKE, I. T. S. *Tese (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, UFSM 1998.*
- 11 – TSCHESCHE, R., WILHEM, H. & FEHLHABER, *Tetrahedron Lett.*, (26), 20609-2612, **1972.**
- 12 – WASICKY, R., WASICKY, M., *Planta Med.* 12, 13-25, **1964.**
- 13 – TSCHESCHE, R., WELTERS, R., FEHLHABER, H. W., *Chem. Ber.*, 100, 323-334, **1967.**
- 14 – GONZALEZ, M. S., MASCARETTI, O.A., MERKUZA, V. M., *Phytochemistry*, 13, 2865-2869, **1974.**
- 15 – TSCHESCHE, R. e AMMERMAN, E., *Chem. Ber*, 107, 2274-2283, **1974.**
- 16 – TSCHESCHE, R. e HILLEDRAND, D. *Phytochemistry*, 16, 1025-1028, **1977.**

- 17 – TSCHESCHE, R. e HILLEDRAND, D. *Phytochemistry*, 16, 1817, **1977**.
- 18 – MOREL, A. F., MENEZES, A. S., MOSTARDEIRO, M. A., and ZANATTA, N., *Phytochemistry*, 38 (03), 783-786, **1995**.
- 19 - MOREL, A. F., MACHADO, E. C. S., MOREIRA, J. J., MENEZES, A. S., MOSTARDEIRO, M. M., ZANATTA, N., and WESSJOHANN, L. A., *Phytochemistry*, Vol. 47, No. 1, pp. 125-129, **1998**.
- 20 – MOREL, A. F., ARAÚJO, C. A., SILVA, U. F., HOELZEL, S. C. S. M., ZÁCHIA, R., BASTOS, N. R., *Phytochemistry*, 61, 561-566, **2002**.
- 21 – GIACOMELLI, S. R., **Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia***. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS, 13, 14, **2009**.
- 22 – TSCHESCHE, R. e AMMERMAN, E., und FEHLHABER, H-W., *Tetrahedron Lett.* 46, 4405, **1971**.
- 23 – MOREL, A. F., BRAVO, R. V. F., REIS, F. D. A. M., and RUVEDA, E. A., *Phytochemistry* 18, 473, **1979**.
- 24 – TAN, N. H., and ZHOU, J. *Plant Cyclopeptides Chem. Rev.* 106, 840-895, **2006**.
- 25 – ALLINGER, N. L., CAVA, M. P., JONGH, D. C., LEBEL, N. A., STEVENS, C. L., Química Orgânica New York, Worth Publishers, 510-512, **1976**.
- 26 – MALDANER, G., **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS, em andamento.
- 27 – MCMURRY, J. Química Orgânica, Vol. Único. 270-300. SP, Ed. Pioneira Thomson Learning, **2006**.
- 28 – VERLI, H. and BARREIRO, E. J., UM PARADIGMA DA QUÍMICA MEDICINAL: A FLEXIBILIDADE DOS LIGANTES E RECEPTORES *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 1, 95-102, **2005**.
- 29 – SILVERSTAIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C., Spectrometric identification of organic compounds. Singapore, John Wiley & Sons, **1991**.
- 30 – CIOLA, R., Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC. 59,60. SP, Ed. Edgard Blücher LTDA. **1998**.
- 31 – DE LIMA, V. R., **Desenvolvimento de estratégias para investigar a localização e efeitos de fármacos incorporados em membranas lipídicas**.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC, 48-51, **2009**.

32 – http://www.bu.ufsc.br/design/normas_brasileiras.php pesquisado 07/05/09.